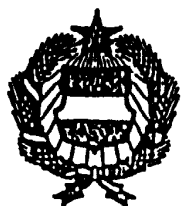


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

198218 B

(51) Int. Cl.⁴

C 07 K 13/00
C 07 K 15/06
C 07 K 3/20

(22) Bejelentés napja: 1988.08.09. (21) 4131/88

(30) Bejelentés elsőbbsége:
P 37 26 655.1 87.08.11. DE

(40) Közzététel napja: 1989.04.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1989.11.28.



(72) Feltalálók:

Dr. DÖRSCHUG Michael, Bochum
Dr. OBERMEIER Rainer, Hattersheim/Main,
(DE)

(73) Szabadalmaz:

Hoechst Aktiengesellschaft
Frankfurt/Main, (DE)

(54) ELJÁRÁS BÁZIKUS PROTEINEK IZOLÁLÁSÁRA PROTEINELEGYEKBŐL

(57) KIVONAT

Proinzulin és/vagy ennek természetes, fél-szintetikus vagy géntechnikai eredetű származékai enzimatis hasításával kapott proteinkeverékekből bázikus proteineket különösen el ioncserélős kromatográfiával. Az eljárás során erősen savas kationcserélőt alkalmaznak továbbá víz és 1-4 szénatomos alkanol keverékével eluálnak.

HU 198218 B

A leírás terjedelme: 5 oldal, 1 rajz, 2 ábra

A találmány tárgya eljárás bázikus proteinek elkülönítésére proinzulin és/vagy származékaik enzimatis hasításakor keletkező proteinkeverékekből.

Humáninzulin géntechnikai előállításánál az inzulin bioszintézisét egy prekursoron, a proinzulinon keresztül hajtják végre, melynek során a B-láncot a C-peptiden (= Connecting Peptide) át kapcsolják össze az A-láncsal. Az *Escherichia coli* révén végbemelő géntechnológiai folyamatban olykor előbb egy fúziós proteint kapunk, melynél a proinzulinhoz még egy idegen protein, például β -galaktozidáz kapcsolódik. Ezt az idegen proteint a további feldolgozás előtt először le kell hasítani, pl. halogén-cianiddal (1. DE-OS 34 40 988). A halogén-cianiddal való hasítás után a cisztein-maradékot szulfitolizissal (nátrium-szulfittal és nátrium-tetratioáttal való kezeléssel) S-szulfonáttá alakítjuk. Ebből a formából a molekulát redukív úton (például merkaptó-etanollal való kezeléssel bázikus oldatban) a diszulfid-híd képzése közben natív térszerkezetébe viszik át. A proinzulinból illetve pre-proinzulinból (a = proinzulin származéka; a „pre” előtag a proinzulin N-terminusán lévő egy vagy több kiegészítő aminosavra vonatkozik) enzimatis hasítással (pl. tripszinnel) egy inzulin-prekuzort, az inzulin-Arg-B31-B32-t és C-peptidet tartalmazó hasítási keveréket állítanak elő. A keverék ezek mellett még néhány mellékterméket, mint pl. inzulin-Des-Thr-B30-t, inzulin-Arg-B31-t valamint nem teljesen lehasadt intermediereket tartalmaz.

A kiindulási anyag kémiai kezelésével első lépésben keletkezett inzulinszármazékokat és vegyületeket egymástól el kell választani. Különösen nehéz ez a feladat, ha bázikus jellegű inzulinszármazékokat kell szétválasztani, amelyek a tercier-szerkezet képződése után a molekulán belül lévő aminosavakon derivatizálódást mutatnak.

Erre vonatkozólag egy összehasonlító kísérlet ad tájékoztatást (1. B rész): a 26 29 568 sz. német szövevényi köztársaság-beli szabadalmi leírás inzulin tisztítására vonatkozó anioncserélő eljárást ismerteti, melynek során az eluáló folyadékhoz a protein-aggregáció elkerülése érdekében nemionos tenzidet adnak. Ez az eljárás jól alkalmazható inzulinok tisztításához, de ha pl. géntechnikai eredetű proinzulin tripszinnel történő hasításával kapott bázikus proteinek elválasztását és elkülönítését kísérik meg, ez nem hozza meg a kívánt eredményt, a szétválasztás nem sikerül. Ezt a megfelelő eluálási profil (1. B rész) bizonyítja; látható, hogy az egyes peptidekre vonatkozó hullámcsúcsok egymásba átmennek.

Ismereteseek olyan eljárások is, amelyek segítségével az említett proinzulin hasítási termékek szétválaszthatók. - Steiner és társai a „Journ. of Biol. Chem.” 246, 1365-1374. oldalán (1971) C-peptid elkülönítésére vonat-

kozó eljárásról tájékoztatnak proinzulin hasítási termékből. Ennél az eljárásnál (hozamot nem adtak meg) gyengén savanyú, karboximetilcsoportokat (CM) tartalmazó, cellulózbázisú kationcserélőn kromatografálunk. A felvitelre kerülő és az eluáló oldathoz 7 mól/l karbamidot adnak, hogy megakadályozzák a proteinek aggregációját. Ilyen nagy mennyiségű karbamid jelenléte azonban hátrányos, mert ez proteinszármazékok kialakulásához vezet, elsősorban a szabad aminos csoportok karbamoilizálásához.

Markussen és társai a „Protein Engineering” 1. köt. 3. sz. 205-213. oldalán (1987) kromatográfiás eljárást ismertetnek háromdimenziós, térhálósított poliszacharid mátrix alapú, dietil-2-hidroxi-propil-amino-etil-tartalmú (QAE) anioncserélőn. - Ennél az eljárásnál - az anioncserélő kromatográfia hozamát nem adták meg - a proteinek aggregációjának meggátolására 60%-os etanol-oldatban dolgoznak. A koncentrált etanol-oldatok alkalmazásának az a hátránya, hogy a koncentrált szerves oldószerekkel kapcsolatban szükséges technikai, biztonsági előírásokat kell követni. Másfelől pedig az említett alkohol-koncentrációnál a proteinek denaturálódása lép fel.

A fentiek ismeretében azt a feladatot tűztük ki, hogy megfelelő szétválasztási és elkülönítési eljárást dolgozzunk ki bázikus proteinek előállításához proteinkeverékekből. Azt tapasztaltuk, hogy ha a proteinkeverékeket erősen savas kationcserélőn kromatografáljuk és az eluáláshoz viszonylag kis mennyiségű alkoholt használunk, a technika állásához képest egyrészt a szétválasztás kedvezőbb eredményt ad, másrészt a proteinek átalakulása is messzemenően elkerülhető. Figyelemreméltó, hogy olyan származékok is elválaszthatók, amelyek - a proinzulin előkezelésénél keletkező - változást mutatnak a szóbanlevő proteinek tercier-szerkezetében. A szétválasztott proteinek aggregációjára nem került sor. Az ioncserélő ismételt alkalmazása semmiféle nehézséget nem okoz.

A találmány tárgya tehát eljárás bázikus proteinek elkülönítésére proinzulin és/vagy ennek természetes, félszintetikus vagy géntechnikai eredetű származékai enzimatis hatásával kapott proteinkeverékekből, melynek során a proteinkeveréket ioncserélőre vesszük fel és eluáljuk. Találmányunkat az jellemzi, hogy ioncserélőként erősen savas kationcserélőt alkalmazunk és az eluáláshoz víz és 1-4 szénatomos alkanol keverékét használjuk, a keverék kb. 10-50 térfogat%, előnyösen kb. 20-40 térfogat%, különösen 30 térfogat% alkanolt tartalmaz. A találmány szerinti eljárással nagy hozammal lehet bázikus proteinek elkülöníteni tetszés szerinti proinzulinok illetve ezek származékai, mint pl. majom-pre-proinzulin hasítási keverékeiből. Ioncserélőként elvben valamennyi erősen savas kationcserélő szóba jöhet. Előnyösek

azok az erősen savas kationcserélők, melyek funkciók csoportként szulfocsoportot, különösen szulfo-propilcsoportot ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$) tartalmaznak, pl. hidrofíli, hidroxicsop-
 portot tartalmazó vinilpolimer (pl. ^(B)Fractogel TSK, gyártó cég Merck, Darmstadt), akril-kopolimer (pl. SP ^(B) Trisacryl M, gyártó cég Réactifs IBF, Villeneuve-la-Gavanne, Franciaország) mátrixon vagy térhálós agaróz részt tartalmazó géleken (pl. S-^(B) Sepharose, gyártó cég Pharmacia, Upsala, Svédország); különösen előnyös az S-Sepharose.

Közvetlenül a hasítási keverék felvitele előtt az erősen savas kationcserélőhöz pufferoldatot kell adni. A pufferoldat előnyösen víz és 1-4 szénatomos alkohol keveréke, melyben az alkohol mennyisége előnyösen kb. 10-50 térfogat%, célszerűen kb. 20-40 térfogat%, különösen kb. 30 térfogat%. Előnyben részesülnek az etanol és az izopropanol, különösen az izopropanol. A pufferoldathoz további adalékanyagok adhatók, pl. só, előnyösen fiziológiásan elviselhető ásványi sók, egy vagy több tetszés szerinti szerves sav, előnyösen tejsav, valamilyen bázis, előnyösen NaOH, és/vagy konzerváló anyagok. A pufferoldat előnyös pH-értéke kb. 2,5-5,5 között, különösen kb. 3,5-4,0 között van.

Az erősen savas kationcserélőre való felvitelhez a hasítási keveréket egy pufferoldatban - előnyösen az előbbieken leírt összetételben és a megadott pH értéken - oldjuk és az így kapott oldatot az erősen savas kationcserélővel érintkezésbe hozzuk.

Az eluáló oldat - melynek lényegében az előbb leírt pufferoldattal azonos összetétele van - pH-értéke előnyösen 3,5-4,0 között van. Különösen olyan elúciós eljárás minősül előnyösnek, melynél az eluáló oldat előnyösen lineáris felfutású sókoncentráció-gradienst mutat.

Ez a koncentráció-gradiens például úgy hozható létre, hogy az eluálás kezdetén az eluáló oldat sókoncentrációja csekély (határesetben közel 0) és az elúciós folyamat során a sókoncentrációt növeljük. Ezen a módon a proteinkeveréket különösen hatékonyan lehet szétválasztani. Az előnyös sókoncentráció-gradiens a közel 0 mól só/l (az eluálás kezdete) és a kb. 1 mól só/l (az eluálás vége, között váltakozhat, különösen előnyös a kb. 0,15 (az eluálás kezdete) és a 0,35 mól/l (az eluálás vége) közötti érték. Sóadalékként számos szerves és szervetlen só jöhet számításba. Előnyösek a fiziológiásan elviselhető sók, mint az ammónium- és alkáli-sók, célszerűen nátrium-sók, különösen a nátrium-klorid.

A találmány szerinti szétválasztási eljárást különböző módon, előnyösen oszlopon vagy szakaszosan valósíthatjuk meg. A hőmérsékletet - amelyet az ioncserélő-kromatográfiában előnyösen konstans értéken kell tartani - széles körben variálhatjuk. Előnyös

a kb. -10 °C-50 °C közötti, különösen a 15-20 °C közötti hőmérséklet-intervallum.

Az alábbi kiviteli példában (A) a találmányt közelebbről mutatjuk be. Az utána következő összehasonlító példával (B) a találmány szerinti eljárás előnyeit kívánjuk bizonyítani a technika állásához tartozó (26 29 568 sz. NSZK-beli szabadalmi leírás), inzulin tisztítására vonatkozó eljárással szemben.

A) példa a találmány szerinti eljáráshoz

50 mmól/l tejsavat, 30 tömeg% izopropanolt és 1 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó kb. 3,5 pH-értékű vizes pufferoldatban 6 l S-Sepharose-t feliszapolunk és kb. 80 cm magasságban 10 cm átmérőjű oszlopba töltünk. Az oszlopot 10 l vizes start-pufferoldattal (50 mmól/l tejsav, 30 tömeg% izopropanol, 0,15 mmól/l nátrium-klorid, pH-érték kb. 3,5) tartjuk egyensúlyban. Pre-prohumáinzulin tripszinnel végrehajtott hasításából származó, 6,2 g inzulin-Arg-B31-32-t, 3 g inzulin-Arg-B31-t és inzulin-Des-Thr-B30-t, valamint ismeretlen hasítási intermediereket és származékokat tartalmazó kristályos hasítási keverékből 15 g-t 3 l start-pufferben oldunk és az oszlopra felvisszük. Utána 50 mmól/l tejsavat és 30 tömeg% izopropanolt tartalmazó, 3,5 pH-értéken (NaOH-val beállított) vizes oldattal és 0,15 mól/l-0,35 mól/l gradiensű nátrium-koriddal eluáljuk. Az eluáló oldat tömege 2 x 20 l. Az átfolyási sebesség 1,5 l/óra. Azokat a frakciókat, melyek inzulin-Arg-B31-32 tartalma HPLC (High Pressure Liquid Chromatography = nagynyomású folyadék-kromatográfia) szerint 90% föltött van, összegyűjtjük, 1:1 arányban vízzel hígítjuk, majd 10 ml 10%-os ZnCl_2 -oldat/oldat hozzáadásával és a pH 6,8-ra való beállításával kicsapjuk. A hozam 5 g inzulin-Arg-B31-32, ami az inzulin-Arg-B31-32-re vonatkoztatva 80% oszlophozamnak felel meg.

B) összehasonlító példák

Az I összehasonlító példát a 26 29 568 sz. NSZK-beli szabadalmi leírás, és a II példát a találmány szerint hajtottuk végre. Az 1. táblázatban az eljárási paramétereket és az elért eredményeket állítottuk egymással szembe. Az 1. ábra az I összehasonlító példánál, a 2. ábra a II, a találmány szerinti eljárásnál felvett elúciós profilt mutatja. Az A abszorpciót az UV-tartományban 278 nm hullámhosszúságnál (A_{278}), szemben az elúciós idővel illetve a frakciók számával vittük fel. Az elúciós profilok mutatják, hogy a találmány szerint jobban szétválaszthatók a bázikus proteinek, mint a 26 29 568 sz. NSZK-beli szabadalmi leírásban ismertett eljárással. Ennek megfelelően a találmány szerinti eljárás nagyobb hozamot és a termék nagyobb tisztaságát is eredményezi (l. 1. táblázat).

1. táblázat

Összehasonlító ioncserélős kromatográfia
(E. coli révén géntechnikailag előállított
majom-proinzulin tripszines kezelésével
nyert proteinkeverékre vonatkozóan)

I. Összehasonlító példa (26 29 568 sz. NSZK-beli szabadalmi leírás alapján)		II. Találmány szerinti példa	
Ioncserélő:	(¹¹)TSK-DEAE-anioncserélő (funkciós csoportok: dietil-amino-etil-; mátrix: hidroxilcsoportot tartalmazó vinilpolimerek, előállító: Merck, Darmstadt)	S-(¹¹)Sephacrose-kationcserélő (funkciós csoportok: szulfo-propil-csoportok; mátrix: hidroxilcsoport-tartalmú gél térháló agaróz tartalommal, előállító: Pharmacia, Svédország)	
Puffer, gradiens:	tris(hidroxi-metil)amino-metán/HCl pH 9, 0,1-0,25 mólos NaCl	tejsav, pH 3,5, 0,15-0,35 mól NaCl	
Disszoci- áló közeg:	0,1% (¹¹)Genapolo SE-100 (zsíralkohol- -poliglikol-éter, előállító: Hoechst AG, Frankfurt)	30% izopropanol	
Felviteli:	1 g/l	3 g/l	
Hozam:	kb. 60%	kb. 80%	
Tisztaság:	80-85%	90-95%	
Szétvá- lasztás:	nincs teljes szétválasztás inzulin-Arg- -B31-32, inzulin-Arg-B31 és bázikus szennyezők között	inzulin-Arg-B31-32, inzulin-Arg-B31 és bázikus szennyezők között bázisvonal-szétválasztás	

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás bázikus proteinek elkülönítésére proinzulin és/vagy ennek természetes, fél szintetikus vagy géntechnikai eredetű származékai enzimatis hasításával kapott proteinkeverékekből, melynek során a proteinkeveréket ioncserélőre visszük fel és eluáljuk, *azzal jellemezve*, hogy ioncserélőként erősen savas kationcserélőt alkalmazunk, és az eluáláshoz víz és 1-4 szénatomos alkanol olyan keverékét használjuk, mely 10-50 térfogat%, előnyösen kb. 20-40 térfogat%, különösen 30 térfogat% alkanolt tartalmaz.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy erősen savas kationcserélőként szulfocsoportot, különösen szulfo-propilcsoportot tartalmazó kationcserélőt alkalmazunk.
3. Az 1. vagy 2. igénypontok szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a proteinkeveréket 2,5-5,5 előnyösen 3,5-4,0 pH-értéken visszük fel az erősen savas kationcserélőre.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az eluáláshoz, víz és 1-4 szénatomos alkanol olyan keverékét alkalmazzuk, mely alkanolként etanolt vagy izopropanolt, különösen izopropanolt tartalmaz.
5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az elúciós oldat pH-ját 3,5-4,0 pH-értékre állítjuk be.
6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a felvitelre kerülő és az elúciós oldathoz puffert, előnyösen szerves savat, különösen tejsavat alkalmazunk.
7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az eluálást 0-1 mól/l, különösen 0,15-0,35 mól/l ammónium- vagy alkálisó-gradienssel hajtjuk végre.

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest - A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
R-4854 - KJK

90.2150.66-4 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Benkő István vezérigazgató

Int Cl⁴ HU 198218 B
C 07 K 13/00
C 07 J 15/06
C 07 K 3/20

